

AP

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 07184660 A

(43) Date of publication of application: 25.07.95

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C12N 9/52
/(C12N 15/09 , C12R 1:01), (C12N 9/52 ,
C12R 1:19)

(21) Application number: 05349229

(22) Date of filing: 28.12.93

(71) Applicant: TAKARA SHUZO CO LTD

(72) Inventor:
KOYAMA NOBUHITO
MITA MASANORI
ASADA KIYOZOU
KATOU IKUNOSHIN

(54) SUPER-THERMOSTABLE PROTEASOME

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a super-thermostable protein having protease activity, a gene encoding the super-thermostable protein and a super-thermostable proteasome.

CONSTITUTION: This protein has protease activity and super-thermostability, and consists of proteins of the following A and B. A: This protein has an amino acid sequence of formula I or a part thereof. B: This protein has an amino acid sequence of formula II or a part thereof. The gene encodes the protein A or B. The super-thermostable proteasome has activity of hydrolyzing succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine 4-methyl-coumaryl-7-amide, gelatin and a soluble reduced lysozyme.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

Met Ala Phe Val Pro Pro Gln Ala Gly Tyr Asp Arg Ala Ile Thr
5 10 15
Val Phe Ser Pro Asp Gly Arg Leu Phe Gln Val Asn Tyr Ala Arg
20 25 30

Ile Gly Ser Gly Arg Asn Thr Ala Met Ala Ile Phe Gln Glu Lys
170 175 180
Tyr Arg Asp Asp Met Asn Leu Glu Asp Ala Ile Ser Trp Leu
185 190

Thr Thr Thr Val Gly Ile Lys Val Lys Asp Gly Val Val Leu Ala
5 10 15
Ala Asp Thr Glu Ala Ser Leu Asp His Met Val Glu Thr Leu Asn
20 25 30

II
Asp Val Tyr Thr Gly Ser Lys Lys Val Glu Val Val Thr Ile Thr
170 175 180
Lys Asp Gly Met Lys Glu Glu Phe Val Val
185 190

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-184660

(43) 公開日 平成7年(1995)7月25日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09 9/52	Z N A			
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00 (C 1 2 N 15/ 00	Z N A A Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-349229
(22) 出願日 平成5年(1993)12月28日

(71) 出願人 591038141
實酒造株式会社
京都府京都市伏見区竹中町609番地
(72) 発明者 小山 信人
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内
(72) 発明者 三田 正範
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内
(72) 発明者 浅田 起代蔵
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造
株式会社中央研究所内
(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超耐熱性プロテアソーム

(57) 【要約】

【目的】 プロテアーゼ活性を有し、超耐熱性のタンパク質、それをコードする遺伝子、及び超耐熱性プロテアソームを提供する。

【構成】 プロテアーゼ活性を有し、超耐熱性であり、かつ、下記A及びBのタンパク質で構成されるタンパク質。A：配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質。B：配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列又はその一部を有するタンパク質。該A又はBのタンパク質をコードする遺伝子。サクシニル-L-ロイシル-L-ロイシル-L-バリル-L-チロシン4-メチル-L-グルタミン7-アミド、ゼラチン、及び可溶性還元リゾチウムを加水分解する活性を有する超耐熱性プロテアソーム。

LLVY-MCA分解活性を有している。

【0005】本発明者らは超耐熱性プロテアーゼを探索するために鋭意研究を重ねた結果、超好熱性古細菌が超耐熱性プロテアソームを生産することを見いだした。更に該酵素を精製し、該酵素が α 、 β の2種類のサブユニットからなることを見いだした。 α サブユニットをコードする遺伝子にハイブリダイズするプローブをポリメラーゼ連鎖反応によって合成した。一方 β サブユニットの部分アミノ酸配列を決定し、その配列の一部をコードするDNAを合成し、プローブとした。そして前記両プローブを用いて両サブユニットをコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子のDNA塩基配列を決定して本発明を完成した。

【0006】以下、本発明を更に詳細に説明する。本発明に用いられる微生物は超耐熱性プロテアソームを産生する微生物であれば特に限定されないが、例えば超好熱性古細菌であるピロコッカス属に属する菌株を用いることができ、例えばピロコッカス フリオサス DSM 3638やピロコッカス ボウゼイ (*Pyrococcus woesei*) DSM 3773を用いることができる。なお、該両菌株は、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメンウント ツェルクルチュウレン GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) より入手可能な菌株である。

【0007】これらの菌株より超耐熱性プロテアソームを調製する方法としては菌体を破碎し、粗抽出物から適当なカラムクロマトグラフィーの組合せで超耐熱性プロテアソームを精製する方法が有効である。例えば、ピロコッカス フリオサスを培養し、菌体を超音波破碎し、細胞粗抽出液をカラムクロマトグラフィーの組合せ、例えば陰イオン交換カラムであるモノ (Mono) Q (ファルマシア社製) とゲルろ過カラムであるセファクリル (Sephacryl) S-300 (ファルマシア社製) を用いることができる。精製の指標となる酵素活性の測定方法としては例えば基質として20 μ MのLLVY-MCAを用い、20mMトリス (Tris) -HCl (pH 8.0)、1mMEDTA、1mM DDT (以下、TEDと略す) 中で0.1M CaCl₂存在下70°Cで30分間反応させた後、反応液の1/3量の25%酢酸を加えて反応を停止させ、励起波長355nmで460nmの蛍光を測定する方法が有効である。モノQカラムの展開溶媒は例えばTEDに0から1MのNaCl濃度勾配をかければよく、セファクリルS-300の展開溶媒はTEDに0.5MのNaClを加えたものが使用できる。

【0008】こうして精製したプロテアソームの酵素化学的性質及び理化学的性質は以下の通りである。

(1) 作用

本発明のプロテアソームはLLVY-MCAを加水分解して蛍光物質を生成する。また、ゼラチンを加水分解して低分子化する。可溶性還元リゾチーム (生化学工業社

製)を加水分解して短鎖ペプチドを生成する。

(2) 酵素活性測定方法

本酵素の活性はLLVY-MCAを加水分解して生成する7-アミノ-4-メチルクマリリン (以下、AMCと略す) を蛍光光度計で定量することにより測定した。すなわち酵素活性を測定しようとする酵素標品を希釈し、その試料溶液10 μ lにTEDに溶解した20 μ M LLVY-MCA、0.1M CaCl₂、140 μ lを加え、70°Cで反応させる。25%酢酸50 μ lを加えて反応を停止させた後、励起波長355nmで460nmの蛍光を測定して生成したAMC量を求めた。ゼラチン分解活性は以下のようにして測定した。0.2%ゼラチン、0.1M CaCl₂を含むTEDに酵素標品を加え、75°Cで30分間反応させ、この反応液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、SDS-PAGEと略す) で分析した。また、10nmolの可溶性還元リゾチームを酵素と0.1M CaCl₂を含むTED中で反応させ、その反応液をデルタバック C₁₈逆相カラム (ウォーターズ社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーで分析した。本発明により得られるプロテアソームはpH 8、70°Cにおいてゼラチン及び可溶性還元リゾチームを加水分解した。

【0009】以下(3)~(8)に示す酵素活性は特に示さない限り上記のLLVY-MCAを基質とする活性測定方法で測定したものである。

(3) 至適温度

様々な温度でLLVY-MCAの分解活性を測定した。本発明のプロテアソームは図1に示すようにpH 8において40°Cから90°Cの間で活性を持ち、その至適温度は70°Cから90°Cであった。図1は本発明により得られる酵素の至適温度を示す図であり、縦軸は相対活性(%)、横軸は温度(°C)を示す。

(4) 至適pH

0.1M CaCl₂、1mM DTTを含む20mM緩衝液中で20 μ M LLVY-MCAの加水分解活性を測定した。用いた緩衝液はpH 3.0~4.0においてクエン酸ナトリウム、pH 4.0~6.0において酢酸ナトリウム、pH 7.0~8.0においてPIPES-Na、pH 9においてトリス-HCl、pH 10.0~11.0においてアラニン-Na、pH 11.0~12.0においてホウ酸ナトリウムである。本酵素は図2に示すようにpH 7で最も高い活性を持つ。図2は本酵素の至適pHを示す図であり、縦軸に相対活性(%)、横軸にpHを示す。

(5) 熱及び界面活性剤に対する安定性

1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下本酵素を100°Cで熱処理した後、活性を測定した。その結果、本酵素は2%SDS中で30分熱処理しても約80%の活性を有していた。図3は本酵素のSDS中での熱安定性を示すものであり、縦軸に相対残存活性(%)、横軸

を常法に従いニトロセルロース膜又はナイロン膜に転写し、ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションに用いるプローブとしては、①βサブユニットの部分アミノ酸配列の全てのコドンを含む混合合成DNA、②プロテアソーム生産菌のコドン使用頻度を基にした、より少ない組合せの混合合成DNA、③2カ所以上のアミノ酸配列を基に混合プライマーを合成してポリメラーゼ連鎖反応を行って得られるより長鎖のDNA、等が挙げられるが、プロテアソームβサブユニット遺伝子に特異的にハイブリダイズするものならばどのようなものでもよい。プローブの標識方法は³²P、蛍光基、ビオチン等を5'又は3'末端、あるいはプローブDNAの内部に取り込ませる方法が挙げられるが、βサブユニット遺伝子とプローブのハイブリダイゼーションを検出できる方法ならばどれでもよい。配列表の配列番号4に示される上記①のプローブの5'末端を³²Pで標識してサザンハイブリダイゼーションを行うとプロテアソームβサブユニット遺伝子を含む制限酵素断片の分子量はHindIII消化した場合5.6kb、BamHI消化した場合1.9kb、HindIIIとBamHIで二重消化した場合1.7kbと決定されるので目的の断片の両端は一方がHindIII部位、他方がBamHI部位であることがわかる。BamHIで消化したピロコッカス フリオサスDNAをアガロースゲル電気泳動で分離し、目的の1.9kbDNA断片を含むゲル断片を切り出し、常法によってDNAを回収し、そのDNAを更にHindIIIで消化したのちアガロースゲル電気泳動で分離し、1.7kbDNA断片を含むゲル片からDNAを抽出すると目的の1.7kb HindIII + BamHI断片が高度に濃縮される。このDNA混合物を用いてライブラリーを作製すると全DNAでライブラリーを作製する場合に比べてより少数のクローンをスクリーニングすればよい。

【0014】作製したライブラリーをサザンハイブリダイゼーションに使用できるプローブの内のどれかを用いてコロニーハイブリダイゼーション又はブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングしてプロテアソームβサブユニット遺伝子の少なくとも一部を含むDNA断片を得る。例えば上記DNA混合物をHindIIIとBamHIで二重消化したpUC119と連結し、大腸菌JM109株を形質転換したのちサザンハイブリダイゼーションで用いたプローブによるコロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングすればプロテアソームβサブユニットをコードするDNA断片を挿入断片として持つプラスミドpPROβBHが得られる。pPROβBHの制限酵素地図を図9に示す。もしこうして得られた断片が目的の遺伝子の一部しか含まない場合はこの断片をプローブにして別の制限酵素で作製したライブラリーをスクリーニングすることにより全長をコードするDNA断片が得られる。

【0015】プラスミドpPROβBHにより形質転換

された大腸菌JM109株はEscherichia coli JM109/pPROβBHと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13987として寄託されている。

【0016】こうしてクローン化できたプロテアソームβサブユニット遺伝子のDNA塩基配列は例えばジデオキシ法又はマクサム・ギムバート法によって決定できる。1.7kb DNA断片を種々の制限酵素で断片化してサブクロニングし、内部配列の決定を容易にする、決定された部分配列を元に新たに配列決定用のプライマーを合成して端から順番に配列を決定する、適当な制限酵素で配列決定に都合のよい欠失プラスミドを構築する、等の方法を組合せれば1.7kb断片のDNA塩基配列を決定できる。本断片には196アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレームが認められ、N末端から7番目のスレオニン残基以下がプロテアソームβサブユニットのN末端配列と完全に一致する。プロテアソームβサブユニットをコードする領域のDNA塩基配列を配列表の配列番号5に示す。すなわち配列表の配列番号5は本発明により得られるプロテアソームβサブユニット遺伝子のDNA塩基配列の一例である。該DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

【0017】また、プロテアソームαサブユニットをコードする遺伝子についても同様にクローニングを行うことができるが、特に本発明者らは、中等度好熱性古細菌であるサーモプラズマ アシドフィラムのプロテアソームβサブユニット遺伝子〔ズウィックル (Zwickl) ら、フェブス レターズ (FEBS Letters) 第278巻、第217~221頁 (1991)〕が報告されているのに着目し該遺伝子情報を基に超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサスのプロテアソーム遺伝子をスクリーニングする方法を検討した。中等度好熱性古細菌の遺伝子により超好熱性古細菌の遺伝子が単離された例はない。

【0018】サーモプラズマ アシドフィラムのゲノム遺伝子を鋳型としてPCR反応により合成したプローブを用いてピロコッカス フリオサスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、驚くべきことにピロコッカス フリオサスのプロテアソームαサブユニット遺伝子を含むDNA断片を得ることが可能であった。

【0019】プロテアソームαサブユニットをコードする領域のDNA塩基配列を配列表の配列番号6に示す。すなわち配列表の配列番号6は本発明により得られるプロテアソームαサブユニット遺伝子のDNA塩基配列の一例である。該DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0020】本発明により単離された遺伝子を適当な宿主ベクター系に組込むことにより超耐熱性プロテアソームの遺伝子工学的生産が可能である。遺伝子工学的生

方法により上記ナイロン膜上のDNAと50℃で一晩ハイブリダイズさせ、0.2×SSC中、室温で洗ったあとオートラジオグラフィーを行った。その結果、1.7 kbの断片がプローブとハイブリダイズすることが明らかとなった。

【0026】ピロコッカス フリオサスゲノムDNA 100 μgをEcoRI消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、1.7 kbのDNAを含むゲル断片を切り出し、イージーラップでDNAを抽出した。このDNAをλgt10 EcoRIアーム (ストラタジーン社製) に連結し、ギガバック ゴールド (GIGAPACK GOLD) (ストラタジーン社製) にパッケージングした。こうして作製したライブラリーをサザンハイブリダイゼーションに用いたプローブでスクリーニングして陽性クローンλpro2を得、λpro2の挿入断片をpTV118N (宝酒造社製) にサブクローニングしてpPRO1.7を得た。pPRO1.7中に挿入されているDNA断片について、ジデオキシ法によりDNA塩基配列を決定した。配列表の配列番号6に該配列の一部を示す。すなわち配列表の配列番号6は本発明により得られるプロテアソームαサブユニットの遺伝子のDNA塩基配列の1例である。該配列より推定されるアミノ酸配列を配列番号1示す。

【0027】(βサブユニット遺伝子のクローニング) ピロコッカス フリオサスゲノムDNAをHindIII、BamHI、及びHindIIIとBamHIの3種類の方法で消化し、アガロースゲル電気泳動によって分離した後ゲル中のDNAをサンプルクから〔コールドスプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティスほか著、モレキュラー クローニング、アラボラトリー マニュアル、第2版、第9.38~9.40頁(1989)〕の方法によりナイロン膜に転写した。一方βサブユニットのN末端アミノ酸配列をもとに配列表の配列番号4に示す混合DNAを合成し、メガラベル(MEGALABEL™、寶酒造社製)と〔γ-³²P〕ATP (アマシャム社製) でこのDNAを標識した。この標識DNAをプローブとしてサンプルクから〔コールドスプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティスほか著、モレキュラー クローニング、アラボラトリー マニュアル、第2版、第9.52~9.55頁(1989)〕の方法により上記ナイロン膜上のDNAと50℃で一晩ハイブリダイズさせ、0.2×SSC中、室温で洗ったあとオートラジオグラフィーを行った。その結果、HindIII消化した場合5.6 kb、BamHI消化した場合1.9 kb、HindIIIとBamHIで二重消化した場合1.7 kbの断片がプローブとハイブリダイズすることが明らかとなった。

【0028】BamHIで消化したピロコッカス フリオサスゲノムDNA 100 μgをアガロースゲル電気泳動によって分離し、1.9 kbのDNAを含むゲル片を切

り出してイージーラップ (宝酒造社製) を用いてゲル片からDNAを抽出した。このDNAをHindIIIで消化し、同様にアガロースゲル電気泳動を行って1.7 kbのDNA断片を抽出した。こうして得られたDNAをHindIIIとBamHIで消化したプラスミドpUC119にDNAライゲーションキット (宝酒造社製) で連結し、このDNA溶液で形質転換した大腸菌JM109をサザンハイブリダイゼーションのプローブでコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることによりプラスミドpPROβBHを得た。図9にプラスミドpPROβBHの制限酵素地図を示す。

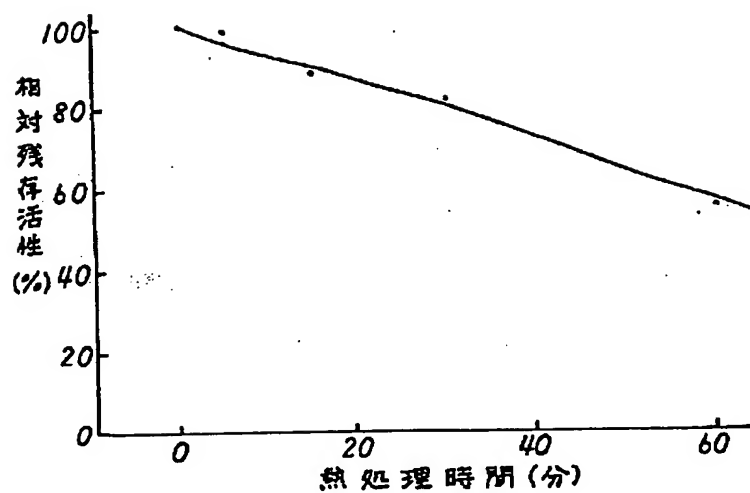
【0029】プラスミドpPROβBHにより形質転換された大腸菌JM109株はEscherichia coli JM109/pPROβBHと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13987として寄託されている。

【0030】プラスミドpPROβBHにつき、様々な欠失プラスミドを構築し、ジデオキシ法により挿入断片のDNA塩基配列を決定した。配列表の配列番号5に該配列を示す。すなわち配列表の配列番号5は本発明により得られるプロテアソームβサブユニット遺伝子のDNA塩基配列の1例である。該DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

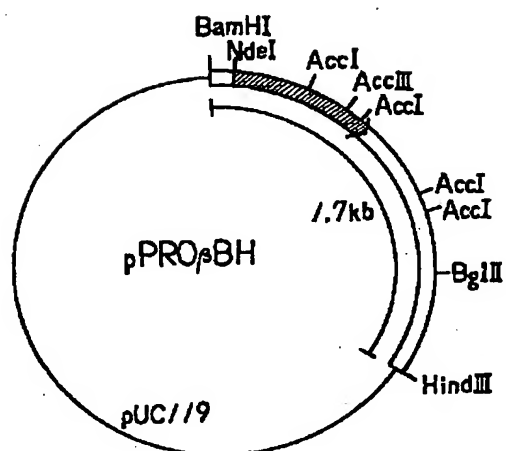
【0031】(αサブユニット遺伝子の発現) 配列表の配列番号9に示すDNAを合成し、メガラベルとATPで5'末端をリン酸化した。このDNAをプライマー、pPRO1.7を鋳型としてミュータン (Mutan)™-K (宝酒造社製) でαサブユニット遺伝子の開始コドンの位置にNcoI部位を導入した。こうして得られたプラスミドpPRON1.7をNcoI消化し、再び環化させることによってベクター由来のlacプロモーターと翻訳開始点のすぐ下流にαサブユニットのコード域を持つプラスミドpPRON1.2を構築した。pPRON1.2をFokIで消化し、クレノウフラグメント (宝酒造社製) を用いて末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動とイージーラップにより約2.3 kbのDNA断片を精製した。該断片をNcoIで消化し、これをNcoI及びHincIIにより二重消化したプラスミドpTV118N (宝酒造社製) と連結し、得られたプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを調製し、約0.7 kbの挿入断片を持つプラスミドpPRON0.7を得た。図10にpPRON0.7の制限酵素地図を示す。pPRON0.7により形質転換された大腸菌JM109株はEscherichia coli JM109/pPRON0.7と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13986として寄託されている。Escherichia coli JM109/pPRON0.7を、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドとアンピシリンを加えたL-ブロス培地で培養すると、タンパク質の発現がみられた。該タンパク質を精製してN

ATGGCATTG TTCCACCTCA GGCTGGGTAC GACAGAGCAA TTACAGTTTT TAGTCCAGAT 60

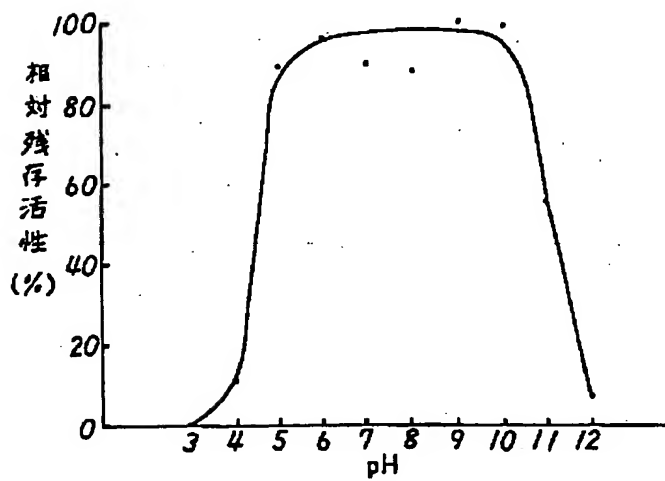
【図3】



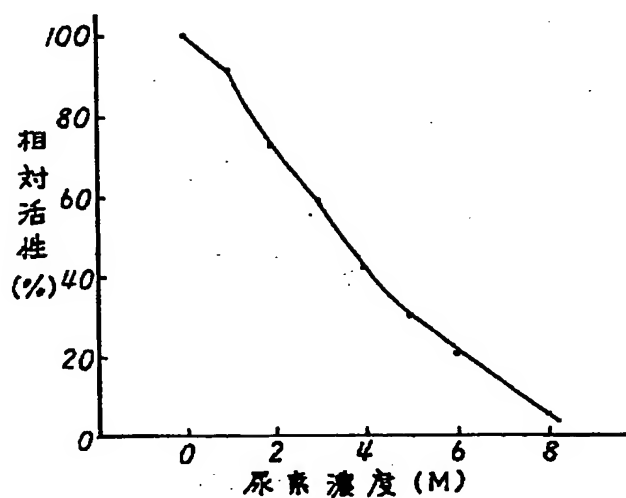
【図9】



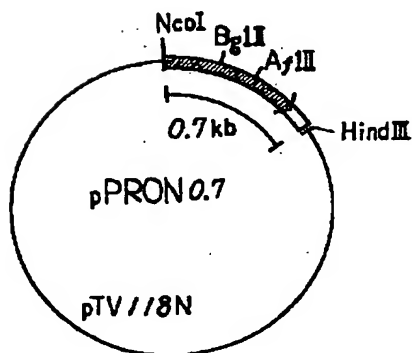
【図4】



【図7】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R	1:01)			
(C 1 2 N	9/52			
C 1 2 R	1:19)			

C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 加藤 郁之進
滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造
株式会社中央研究所内

AQ

1/7/1
DIALOG(R)File 347:JAPIO
(c) JPO & JAPIO. All rts. reserv.

04726770
GENE FOR ULTRA-HIGHLY HEAT-RESISTANT PROTEASE

PUB. NO.: 06-197770 [JP 6197770 A]

PUBLISHED: July 19, 1994 (19940719)

INVENTOR(s): YAMAMOTO KATSUHIKO

NAKAJIMA KYOKO

KOYAMA NOBUHITO

MITA MASANORI

ASADA KIYOZOU

KATOU IKUNOSHIN

APPLICANT(s): TAKARA SHUZO CO LTD [352134] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 05-017068 [JP 9317068]

FILED: January 07, 1993 (19930107)

ABSTRACT

PURPOSE: To provide the method for industrially producing the ultra-highly heat-resistant protease by isolating the gene of the ultra-highly heat-resistant protease and using the isolated gene.

CONSTITUTION: The ultra-highly heat-resistant protease gene expressed with the restriction enzyme map. The method for producing the ultra highly heat-resistant protease is characterized by culturing a transformant produced by introducing a recombined plasmid containing the gene.

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI
(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010000970 **Image available**

WPI Acc No: 94-268681/199433

XRAM Acc No: C94-122508

Ultra heat-resistant protease gene - is obtd. e.g. from
Pyrococcus furiosus DSM 3638

Patent Assignee: TAKARA SHUZO CO LTD (TAKI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC
-----------	------	------	-------------	------	------	----------

JP 6197770	A	19940719	JP 9317068	A	19930107	C12N-015/57
199433	B					

Priority Applications (No Type Date): JP 9317068 A 19930107

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 6197770	A		8			

Abstract (Basic): JP 6197770 A

An ultra heat-resistant protease gene (I) of specified structure is new. Also claimed is (1) ultra heat-resistant protease gene which can be hybridised with (I). The prepn. of an ultra-heat resistant protease comprises introducing a recombinant plasmid to produce a transformant with (I) and culturing.

USE/ADVANTAGE - An ultra heat-resistant protease of high purity can be prepd. in a large amount. In an example, Pyrococcus furiosus DSM3638 was cultured in a medium contg. 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% soluble starch, 3.5% Jamarin S solid, 0.5% Jamarin S liquid, 0.003% MgSO₄, 0.001% NaCl, 0.0001% CoSO₄, 0.0001% CaCl₂.7H₂O, 0.0001% ZnSO₄, 0.1 ppm CuSO₄.5H₂O, 0.1 ppm KAl(SO₄)₂.2H₂O, 0.1 ppm H₃BO₃, 0.1 ppm Na₂MoO₄.2H₂O and 0.25 ppm NiCl₂.6H₂O) at 95 deg.C for 16 hrs.. The culture was centrifuged and the microbial cells suspended in 4 ml 0.05 M Tris-HCl. 0.8 ml lysozyme and 2 ml 0.2 M EDTA were added and the mixture was heated at 20 deg.,C for 1 hr.. 24 ml SET soln., 4 ml 5% SDS and 400 micro-l Proteinase K were added and reacted at 37 deg.C for 1 hr.. The reaction product was extracted with phenol/chloroform and pptd. with ethanol to give 3.2 mg genomic DNA. A cosmid protein library was prepd. Plasmids pPhe2, pPheS3, pPheE1 and pPheE2 contg. (I) were prepd..

Dwg.0/10

Title Terms: ULTRA; HEAT; RESISTANCE; PROTEASE; GENE; OBTAIN

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/57

International Patent Class (Additional): C12N-009/50;

C12N-015/57;

C12R-001-00; C12R-001-19